

Anhang

Studien zu Kontaminationen mit hormonartiger Wirkung bei Mineralwässern

Wagner und Oehlmann, 2009; Wagner und Oehlmann, 2010

In zwei aktuellen Studien (Wagner und Oehlmann, 2009; Wagner und Oehlmann, 2010) untersuchten Wissenschaftler der Goethe-Universität Frankfurt Mineralwasser aus Glasflaschen, PET-Flaschen und Verbundkarton auf estrogenähnliche Wirkungen. In beiden Untersuchungen zeigte sich bei etwa 60 % der untersuchten Wässer eine estrogenähnliche Wirkung.

Die Forscher vertreten die Hypothese, dass die Migration endokriner Disruptoren aus der Verpackung eine wesentliche Ursache für die hormonartige Wirkung ist¹¹.

In der ersten Studie (Wagner und Oehlmann, 2009) wurden Experimente mit Zellkulturen (in vitro), sowie mit Schnecken (in vivo) durchgeführt: Die Untersuchung mit genetisch veränderten Hefezellen (mit humanem Estrogen-Rezeptor) ergab bei 12 von 20 Produkten eine signifikant erhöhte estrogene Aktivität. Im Mittel über alle Proben wurde eine Aktivität von 18 ng/l EEQ gemessen (EEQ: Äquivalente Menge des natürlichen Hormons 17 β -Estradiol, das die gleiche estrogene Wirkung in vitro hätte). Der höchste gemessene Wert betrug 75,2 ng/l (gemessen bei einer PET-Einweg-Flasche).

Vier der untersuchten Wässer wurden sowohl in Glas- als auch PET-Flaschen abgefüllt. Bei drei Produkten war die estrogene Wirkung der Wässer aus PET-Einwegflaschen leicht aber nicht signifikant höher als bei dem gleichen Produkt aus der Glasflasche. Wobei bei einem dieser Produkte zusätzlich auch eine PET-Mehrwegflasche untersucht wurde, welche keine erhöhte estrogene Wirkung im Vergleich zum Wasser in der Glasflasche zeigte. Im vierten Fall waren die Werte der Wässer aus PET- und Glasflasche gleich hoch, hierbei handelte es sich bei der PET-Flasche ebenfalls um eine Mehrwegflasche.

Die Studienautoren interpretieren ihre Ergebnisse als Hinweis darauf, dass die estrogene Wirkung durch endokrin wirksame Substanzen verursacht wird, die sich aus der Kunststoffverpackung ins Wasser lösen. Diese Schlussfolgerung wird jedoch scharf kritisiert (BfR 2011) da die Ergebnisse keine signifikanten Unterschiede zwischen den in PET- und in Glasflaschen abgefüllten Wässern des gleichen Herstellers erkennen lassen. Die Unter-

¹¹ Die Publikationen enthalten keine Angaben zum Material der Verschlusskappen sowie zum Kohlensäuregehalt der untersuchten Wässer. Zur genauen Zusammensetzung der Verschlusskappen lagen keine Informationen vor. Es wurden Wässer mit und ohne CO₂ untersucht, ein Zusammenhang zwischen CO₂ und estrogener Aktivität war nicht festzustellen (persönliche Mitteilung M. Wagner, 2011)

schiede in der estrogenen Wirkung zwischen den Produkten verschiedener Hersteller sind deutlich größer. So liegt der höchste gemessene Wert (75,2 ng/l EEQ) einer PET-Flasche nur geringfügig über dem des gleichen Produkts in der Glasflasche (73,0 ng/l EEQ), während alle anderen gemessenen Werte unabhängig von der Verpackung deutlich niedriger liegen (< 42 ng/l EEQ). Zwar ist die durchschnittliche estrogenen Wirkung aller untersuchter Wässer in PET-Flaschen etwa doppelt so hoch wie die durchschnittliche Wirkung aller untersuchter Wässer in Glasflaschen, jedoch ergibt sich dieser Unterschied vor allem aus den großen Unterschieden zwischen den Wässern der Abfüller, die nur in PET-Flaschen abfüllen und derer, die nur in Glasflaschen abfüllen. Dass Migrationen aus der Verpackung die Hauptursache für die gemessene estrogenen Wirkung ist, lässt sich aus diesen Ergebnissen jedenfalls nicht ableiten.

In einem weiteren Experiment züchteten Wagner und Oehlmann (2009) Schnecken in PET- und Glasflaschen. Die Flaschen wurden mit einer Kulturlösung gefüllt, wodurch Einflüsse einer hormonellen Belastung des Quellwassers oder aus dem Abfüllprozess ausgeschlossen werden konnten. Der Versuch zeigte, dass die Schnecken in den PET-Flaschen eine signifikant höhere Anzahl an Embryonen produzierten als in den Glasflaschen. Die Ergebnisse aus dem Schneckentest korrelierten allerdings nicht immer mit der Analyse der gleichen Flaschen im Hefezellkulturexperiment (z. B. eine Flasche mit hoher Reproduktionssteigerung im Schneckentest und sehr geringer estrogenen Wirkung im Zellkulturtest). Ob die Ergebnisse dieses Tests ausschließlich auf die Wirkung östrogenartiger Substanzen zurückzuführen sind, oder ob auch unterschiedliche Lebensbedingungen der Schnecken in den PET- und Glasflaschen (z.B. Adsorptionseffekte an der Flaschenwand) die Reproduktionsrate beeinflussen ist derzeit nicht gesichert (Bfr 2011).

In einer weiteren Studie (Wagner und Oehlmann, 2010) untersuchten die Forscher die estrogenen Wirksamkeit der Mineralwässer mit einem Zellkultursystem menschlicher Brustkrebszellen (MCF7, E-Screen).

Untersucht wurden dabei Wässer aus Deutschland, Frankreich und Italien in den Verpackungen aus Glas (5 Produkte), PET (12) und Verbundkarton (1). Bei 61,1 % der untersuchten Wässer wurde eine estrogenen Wirksamkeit festgestellt. Von fünf Herstellern wurde das gleiche Produkt sowohl in der PET-Flasche als auch in der Glasflasche analysiert. Die Wässer zweier Hersteller zeigten dabei unabhängig von der Verpackung keine estrogenen Wirksamkeit, bei den anderen drei Herstellern war die estrogenen Wirksamkeit der Wässer in der PET-Flasche signifikant höher als in der Glasflasche. Das Wasser im Verbundkarton zeigte ebenfalls eine hormonelle Wirksamkeit¹². Die durchschnittliche estrogenen Wirksamkeit aller Wässer in dieser Studie betrug $3,33 \pm 0,30$ pg/l EEQ (Maximum $12,2 \pm 3,57$ pg/l EEQ) und ist damit um mehr als den Faktor 1.000 niedriger als in der ersten Studie. Als Ursache dafür vermuten die Forscher methodische Probleme wie z. B. die eingeschränkte

¹² Da das Wasser dieses Herstellers nicht in anderen Verpackungsformen verfügbar war, lassen sich jedoch keine Schlüsse ziehen, ob die hormonell wirkenden Substanzen aus der Verpackung stammen.

Extrahierbarkeit estrogenartiger Stoffe aus dem Wasser¹³ und damit verbundene unterschiedliche Sensitivitäten der verwendeten Testsysteme.

Pinto und Reali, 2009

Pinto und Reali (2009) untersuchten ebenfalls Mineralwässer mit einer Hefezellkultur. Die estrogenen Wirksamkeit der Wässer entsprach 0,9-23,1 ng/l EEQ und liegt damit niedriger als die Ergebnisse des Hefezellkulturexperiments der Universität Frankfurt (bis zu 75,2 ng/l, durchschnittlich 18 ng/l EEQ).

Böhmler et al., 2006 und Folgeuntersuchungen

Untersuchungen zur Estrogenität von Trinkwasser, Mineral- und Tafelwässern mittels E-Screen-Test wurden auch bereits vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) durchgeführt (Böhmler et al., 2006). Die Wässer wurden im E-Screen getestet (Brustkrebszellen). Die Trinkwasserproben zeigten durchwegs keine signifikante estrogenen Wirksamkeit. Bei den Mineral- und Tafelwässern wurden 8 von 37 Proben als estrogen wirksam eingestuft: PET: 20 Proben negativ, 7 positiv, Glas: 1 negativ, 1 positiv, Getränkeverbundkarton: 7 negativ, 1 "verdächtig" (leicht erhöhte estrogenen Wirksamkeit)¹⁴. Es zeigte sich jedoch, dass auch die Quellwässer (vor der Abfüllung) teilweise bereits eine estrogenen Wirksamkeit zeigten, weshalb es die AutorInnen für unwahrscheinlich halten, dass ein Übergang von estrogenartigen Substanzen aus der Verpackung eine bedeutende Rolle spielt. Jedenfalls kann dieser nicht die ausschließliche Ursache für die gemessene estrogenen Wirkung sein. Bei einem Mineralwasser in einer Grünglasflasche wurde allerdings eine deutliche Erhöhung der estrogenen Potenz mit fortschreitender Lagerung beobachtet.

In einer Kooperation mit der TU Braunschweig arbeitet das LAVES derzeit an der Identifizierung der estrogen wirksamen Substanzen in den positiv getesteten Brunnenwässern (Gröll und Engelhardt, 2009; Böhmler et al., 2009). Verpackte Wässer werden in der Untersuchung nicht berücksichtigt. Bei der Untersuchung konnten noch keine für die estrogenen Wirkung verantwortlichen Substanzen eindeutig identifiziert werden. Die Ergebnisse deuten

¹³ Die Forscher testeten in Vorversuchen für den E-Screen-Test unterschiedliche Methoden der Probenaufbereitung und zeigten, dass die Ergebnisse je nach Wahl der Methode sehr unterschiedlich ausfallen können. Die Forscher vermuten, dass nur ein Teil der hormonartigen Substanzen bei der Probenaufbereitung erfasst wird, während manche Stoffe z. B. aufgrund ihrer zu hohen Polarität oder aufgrund ihrer hohen Flüchtigkeit verlorengehen.

¹⁴ Die Ergebnisse wurden als Relativer Proliferationseffekt (RPE) angegeben:
 Relativer Proliferationseffekt (RPE): $PE - 1 (\text{Extrakt}) / PE - 1 (17\beta\text{-Estradiol}) \times 100$
 Proliferationseffekt (PE): max. Zellzahl (Extrakt) / Zellzahl (Negativkontrolle)
 Bewertung der Ergebnisse: RPE ≤ 10 %: negatives Ergebnis, RPE = 10-25 %: schwacher Agonist, RPE=25-80 %: partieller Agonist, RPE = 80-100 %: vollständiger Agonist

darauf hin, dass es sich um eine Substanz/ um Substanzen mit hoher Volatilität handeln dürfte. Der Phthalat- und Pestizidgehalt der Wässer dürfte keine bedeutende Rolle spielen.

Bopp et al., 2010

In einer Studie des CUVS Stuttgart (Bopp et al., 2010) wurden 18 Brunnenwässer (direkt von der Quelle) und jeweils 15 Abfüllungen dieser Wässer in Glas- und PET-Flaschen auf ihre estrogenen Aktivität untersucht. Die Untersuchung umfasste ein biologisches Testsystem (E-Screen) sowie eine instrumentelle Analytik, in der gezielt nach bekannten Xenöstrogenen oder strukturverwandten Verbindungen gesucht wurde. Alle Proben wurden im E-Screen als nicht estrogen wirksam eingestuft. Allerdings lag bereits die Nachweisgrenze in diesem Experiment mit 0,1 ng/l EEQ höher als die Ergebnisse aus anderen E-Screen-Tests¹⁵. Bei 33 Proben¹⁶ wurde eine leichte Änderung des Zellwachstums im Vergleich zur Blindkontrolle gemessen, die als Hinweis auf estrogen wirksame Substanzen in sehr niedrigen, laut den AutorInnen nicht bewertbaren Konzentrationen gedeutet werden¹⁷.

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass die Wässer bei sehr optimalen Lagerbedingungen untersucht wurden: Das Wasser war nach der Abfüllung nur 1-1,5 Wochen in den Flaschen gelagert, bei Temperaturen von 6°C (persönliche Mitteilung, Bopp 2011). Nach einigen Monaten wurde die instrumentelle Analytik wiederholt und zeigte bei einigen Substanzen einen deutlichen Anstieg der migrierten Mengen. Eine erneute Untersuchung auf die estrogenen Wirkung nach mehrmonatiger Lagerung wurde nicht durchgeführt.

In der instrumentellen Analytik wurden mehrere organische Verbindungen nachgewiesen¹⁸. Die ermittelten Konzentrationen liegen größtenteils unter 1 µg/l.

¹⁵ Wagner und Oehlmann (2010) wiesen Werte von bis zu 12,2 pg/l EEQ nach. Die Ergebnisse von Böhmler et al. (2006) sind nicht in EEQ angegeben, eine erneute Analyse der Rohdaten zeigt jedoch, dass die Ergebnisse ebenfalls im Bereich von pg/l EEQ liegen (Wagner und Oehlmann, 2010).

¹⁶ 14 von 18 Brunnenwässern, 11 von 15 Proben aus PET-Flaschen, 8 von 15 Proben aus Glasflaschen.

¹⁷ Diese entsprechen Konzentrationen im Bereich unterhalb von ca. 10-20 pg/l EEQ und wären damit im Bereich der Ergebnisse von Wagner und Oehlmann (2010).

¹⁸ 2-Aminobenzamid (bei PET-Flaschen, Additiv bei der PET-Flaschenherstellung),
2-Aminobenzonitril (Verwendungszweck unbekannt, möglicherweise im Zusammenhang mit Farbstoffen oder als NIAS bei PET-Herstellung),
4(H1)Chinazolinon (bei PET-Flaschen),
1(3H)-Isobenzofuranon (bei Glasflaschen mit Alu-Verschlüssen bestimmter Verschlusshersteller),
Di-iso-nonylphthalat (DINP) (bei Glasflaschen mit Alu-Verschlüssen bestimmter Verschlusshersteller),
Antioxidantien des IRGANOX-Typs (z. B. 2,4-Di-tert-butylphenol, 7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-dien-2,8-dion, Di-tert-butyl-benzochinon),
Citroflex A (Tributyl-acetylcitrat) (bei Glas-Flaschen mit Alu-Verschluss),
Tributylacnitrat (bei Glas-Flaschen mit Alu-Verschluss),
n-Butylcitrat (bei Glas-Flaschen mit Alu-Verschluss),
Butylhydroxytoluol (BHT) (bei Glasflaschen mit Alu-Verschlüssen bestimmter Verschlusshersteller),
1,2-Cyclohexandicarbonsäure-Diisononylester (DINCH) (in Glasflaschen mit Alu-Verschluss),
3,5-bis-(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxy-phenylpropane-säure-methylester (in Glasflaschen mit Alu-Verschluss),
2-Phenylphenol,
Oleamid (in PET-Flaschen) und andere Fettsäureamide (in allen Flaschen, höhere Konzentrationen in Glasflaschen mit Alu-Verschlüssen bestimmter HerstellerInnen)

Höhere Werte wurden bei 4(1H)-Chinazolinon (bis zu 2 µg/l) und 2-Aminobenzamid (bis zu 17 µg/l) nachgewiesen. Bei den identifizierten Substanzen handelt es sich größtenteils um Kunststoffadditive und deren Abbauprodukte, die zum Teil durch Migration aus der Verpackung, aber auch durch andere Eintragswege (z. B. bei der Abfüllung verwendete Schläuche, Kunststoffverbindungen, -dichtungen) in das Wasser gelangen können. Bei den meisten Verbindungen besteht ein klarer Zusammenhang zur verwendeten Verpackung (Flasche bzw. Verschluss), was zeigt, dass für diese Verbindungen die Migration aus der Verpackung entscheidend ist. Dabei spielt nicht nur das Verpackungsmaterial (Glasflasche/PET-Flasche, Alu-Verschluss mit verschiedenen Dichtungen, Kunststoffverschluss mit/ohne Inlet), sondern auch die Herkunft (HerstellerIn) eine entscheidende Rolle²². Bei einigen Substanzen wurde mit erneuten Untersuchungen nach mehrmonatiger Lagerung über die Zeit ansteigende Konzentrationen nachgewiesen¹⁹, was wiederum ein klarer Hinweis für Migration aus der Verpackung ist. Auffallend ist, dass keine der identifizierten Substanzen in Wässern aus Glasflaschen mit Kunststoffverschluss (ohne Inlet) nachgewiesen wurde. Dies deutet darauf hin, dass die identifizierten Substanzen bei PET-Flaschen sehr wahrscheinlich aus dem PET-Material und nicht aus den Verschlüssen stammen, bei Glasflaschen jedoch aus den Verschlusskappen (Alu-Verschlüsse mit verschiedenen Dichtungsmaterialien werden bei PET-Flaschen nicht eingesetzt) und nicht aus dem Flaschenmaterial.

Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) informiert in einer Stellungnahme (BfR, 2011) zu hormonartigen Wirkungen von Mineralwässern über die bekannten toxikologischen oder hormonellen Wirkungen der von Bopp et al. (2010) identifizierten Substanzen. Nach Ansicht des BfR sowie der StudienautorInnen ist durch die nachgewiesenen Substanzen in den vorliegenden Konzentrationen nach dem derzeitigen Wissensstand keine nennenswerte estrogenische Wirkung zu erwarten, wenn auch zumindest für einzelne Substanzen begrenzte Hinweise auf endokrine Wirkungen vorliegen (z. B. BHT). Allerdings liegen für einen großen Teil der identifizierten Substanzen bisher keine Untersuchungen zu möglichen hormonaktiven Wirkungen vor, darunter auch 4(1H)-Chinazolinon und 2-Aminobenzamid, von denen die höchsten Konzentrationen gefunden wurden.

Da Xenoestrogene keine chemisch einheitliche Gruppe sind, ist es unwahrscheinlich, dass mit dem Untersuchungsansatz (Suche nach bekannten Xenoestrogenen und strukturverwandten Verbindungen) alle potentiellen Xenoestrogene in den Wässern vollständig erfasst wurden.

Kritik: Migrationstheoretische Überlegungen; Franz und Welle, 2009

Forscher des Fraunhofer Instituts für Verfahrenstechnik und Verpackung halten es für höchst unwahrscheinlich, dass die in den obigen Studien gemessene Estrogenität allein

¹⁹ 2-Aminobenzamid, 2-Aminobenzonitril, 4(1H)Chinazolinon, 1(3H)-Isobenzofuranon, DINP, BHT

durch einen Übergang von Stoffen aus der Verpackung in das Getränk verursacht sein kann (Franz und Welle, 2009). Sie argumentieren anhand eines migrationstheoretischen Modells, dass dafür im PET-Material oder in den Flaschenverschlüssen potentielle Xenöstrogene in Konzentrationen vorhanden sein müssten, die weit über den bisher bekannten Konzentrationen liegen (unter der Annahme, dass diese Stoffe 1.000-mal schwächer wirksam sind als 17 β -Estradiol, zum Vergleich: 4-Nonylphenol wirkt etwa um den Faktor 5.000 schwächer als 17 β -Estradiol, Bisphenol A um den Faktor 15.000). Wagner und Oehlmann (2010) bestätigen, dass die in ihren Studien gemessene Wirkung nicht durch einzelne bekannte endokrine Disruptoren aus der Verpackung verursacht werden kann, sehen darin jedoch keinen Widerspruch zur Überlegung, dass Migration aus der Verpackung eine Ursache für die estrogene Wirkung ist. Sie vertreten die Hypothese, dass die gemessene Estrogenität durch die kombinierte Wirkung mehrerer schwach estrogener Stoffe oder durch eine unbekannte Substanz mit sehr hohem estrogenen Wirkungspotenzial verursacht wird.

Phthalate in PET?

Zu den potentiellen Xenöstrogenen in Kunststoffen zählen beispielsweise Phthalate (Phthalsäureester, als Weichmacher eingesetzte Kunststoffadditive). Bei der Produktion des Stoffes PET werden jedoch keine Phthalate eingesetzt (Vasami, 2010). Die Migration von Phthalaten aus dem PET-Material trägt daher vermutlich höchstens einen geringen Teil zur gemessenen Hormonaktivität bei. Die Migration geringer Mengen an Phthalaten wurden allerdings in mehreren Studien nachgewiesen. Die Studien liefern jedoch keine genauen Informationen zur Herkunft dieser Phthalate. Sax (2010a, 2010b) erwähnt als mögliche Ursachen Phthalatkontaminationen von rezykliertem PET²⁰. Auch Phthalate in Verschlussmaterialien, Phthalatbelastungen der Quellwässer oder Kontaminationen bei der Produktion/Abfüllung sind denkbar. Casajuana und Lacorte (2003) fanden einen Anstieg an Phthalaten (DMP, DEP, 4-Nonylphenol, DBP, BPA, BBP, BADGE, DEHP²¹) im Wasser, das 10 Wochen in PET-Flaschen gelagert wurde²². Montuori et. al. (2008) fanden signifikant höhere Mengen an Phthalaten²³ (fast 20fach höhere Werte) in Wasser aus PET-Flaschen als aus Glasflaschen. Dabei wurden 71 Wässer untersucht, die sowohl in PET als auch in Glas abgefüllt wurden. In den Studien wird dargestellt, dass die gemessenen Phthalatbelastungen der Wässer aus PET-Flaschen zwar deutlich höher ist als bei Glasflaschen, aber dennoch so niedrig, dass nach dem derzeitigen Wissenstand eher von keiner

²⁰ Er bezieht sich dabei auf konventionelles Recycling, nicht auf „super-clean“-Recyclingverfahren (die in Österreich beim bottle to bottle Recycling angewendet werden).

²¹ Dimethylphthalat (DMP), Diethylphthalat (DEP), 4-Nonylphenol, Di-n-Butylphthalat (DBP), Bisphenol A (BPA), Butylbenzylphthalat (BBP), Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP, bei DEHP keine Angaben über Anstieg nach der Lagerung, da die Messergebnisse vor der Lagerung nicht verwertbar waren)

²² Zusätzlich wurde ein Wasser aus der Glasflasche untersucht, bei dem nach der Lagerung Spuren von DMP und DEP nachweisbar waren, sowie ein Anstieg an 4-Nonylphenol, alle anderen Stoffe waren bei der Glasflasche nicht nachweisbar. Da nur eine Wasserprobe aus der Glasflasche untersucht wurde lassen sich daraus keine allgemeinen Schlüsse für Glasflaschen ableiten.

²³ DEHP, DMP, DEP, Diisobutylphthalat (DiisoBP), DBP

wesentlichen Gesundheitsgefährdung auszugehen ist. Dies ist allerdings im Kontext zu sehen, dass die gesundheitlichen Auswirkungen von hormonell wirksamen Substanzen derzeit noch sehr kontroversiell diskutiert werden, vor allem in Bezug auf Langzeitbelastungen mit niedrigen Dosen und auf Wechsel- und Summenwirkungen unterschiedlicher hormonaktiver Substanzen.